



(19) **RU** (11) **2103994** (13) **C1**

(51) **6 A 61 K 9/52**

Комитет Российской Федерации
по патентам и товарным знакам

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ
к патенту Российской Федерации

(21) 93004902/14

(30) 2178/91

(37) 22.07.91

(33) CH

(46) 10.02.98 Бюл. № 4

(86) PCT/CH 92/00146 (15.07.92)

(72) Фредерик Хаймгартнер(CH), Пьеро Орсолини(CH)

(71) (73) Аста Медика АГ (DE)

(56) DE, патент, 4023134, кл. А 61 К 9/16, 1991.

(54) КОМПОЗИЦИЯ В ФОРМЕ МИКРОСФЕР ДЛЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО И КОНТРОЛИРУЕМОГО ВЫСВОБОЖДЕ-

(22) 15.07.92

НИЯ ПЕПТИДНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА

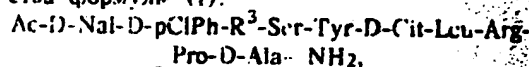
(57) Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности. Композиция, предназначенная для пролонгированного контролируемого введения пептидного лекарственного вещества формулы (1) $\text{Ac-D-Nal-D-pClPhe-R}^3\text{-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH}_2$, в которой R^3 означает D-Pal или D-Trp. Композицию получают в виде микросфер из полимерного материала, поддающегося биологическому разложению, содержащих нерастворимую в воде соль указанного пептида формулы (1). 2 з.п. ф-лы, 1 табл.

RU 2103994 C1

BEST AVAILABLE COPY



Изобретение относится к композиции для пролонгированного и контролируемого высвобождения пептидного лекарственного вещества формулы (I):



в которой R^3 означает D-Pal или D-Trp.

Такие p-пептиды являются аналогами I НРН и предпочтительно могут применяться для терапевтического лечения гормонально зависимых нарушений. В формуле (I)? по крайней мере если нет других указаний, аминокислоты обозначены условно и имеют конфигурацию L; D Nal означает D-3-(2-нфтил)-аланин и D-Pal означает D-3-(3-пиррол)-аланин.

Композицию согласно изобретению получают в виде микросфер из поддающегося биологическому разложению полимерного материала, заключающего в себе нерастворимую в воде соль пептида формулы (I). Такая композиция, содержащая по меньшей мере 5 мас. % нерастворимой соли от массы биоразлагающегося полимерного материала, может выделять пептид формулы (I), контролируемый образом и течение нескольких суток, после ее парентерального введения человеку или животному.

Заявленную композицию получают путем превращения водорастворимой соли пептида формулы (I) в соль пептида, нерастворимую в воде, затем готовят суспензию этой соли в растворе биоразлагающегося полимерного материала, эту суспензию превращают в эмульсию типа масло в воде и, наконец, выделяют микросферы из биоразлагающегося полимера после переноса эмульсии "масло в воде" в избыток водной среды.

К настоящему времени были предложены различные технические решения для получения композиции с пролонгированным контролируемым высвобождением лекарственного вещества, с применением имплантируемых биоразлагающихся элементов, микрокапсул или пористых биоразлагающихся матриц в виде микросфер или микрочастиц разных размеров.

В патенте FPI DE 4023134 описан способ получения фармацевтического препарата с пролонгированным и контролируемым высвобождением активного компонента в форме микрочастиц, содержащих в качестве активного компонента параат, тапнат, стеарат или пальмитат природного или синтетического пептида, а в качестве полимера - сополимер молочной и гликолевой кислоты, при этом количественный состав препарата не оговаривается. В способе согласно патенту FPI

DE 4023134 водонерастворимая соль пептида и биологически разлагающийся полимер размалываются и смешиваются друг с другом в сухом виде при величине зерна менее 200 мкм, затем подвергаются прогрессивной предварительной компрессии и экструзии, после чего производится размалывание при низких температурах (криогенная пульверизация).

В европейском патенте ЕП-А-0.052.510 описано получение микрокапсул путем разделения водорастворимых фаз лекарственного вещества и европейском патенте ЕП-А-0.58.481 или американском патенте US-A-3976071 описано получение

биоразлагающихся имплантируемых элементов или пористых матриц на основе полилактида или сополимера лактидгликолида в качестве необходимых основных составляющих. Эти технологии используют предварительное растворение биоразлагающегося полимера или сополимера, используемого в качестве носителя, в органическом растворителе, а в случае необходимости растворение самого лекарственного вещества.

Другие технологии, также ведущие к образованию микрокапсул или микросфер, используют способы эмульгирования, при этом основная фаза этих способов заключается в получении эмульсии типа масло в воде из органического раствора полимерного материала и водного раствора пептида (см. американские патенты US-A-4384975, 3891570, 4389330, 3737337, 4652441 или международную заявку WO-90/13361). Однако во всех этих случаях специалист вынужден разрабатывать сложные и трудно описываемые технологии, позволяющие максимально уменьшить потери активного пептидного вещества, обладающего исключительно хорошей водорастворимостью, например предусматривающие двойное эмульгирование.

В противоположность этому продукт по изобретению получают другим, более простым способом. Продукт согласно изобретению получают, суспендируя водонерастворимую соль пептида в растворе биологически разлагаемого полимера и вводя суспензию в водный раствор, причем образуется эмульсия типа "масло-в-воде". Затем эту эмульсию отверждают путем разбавления водной фазы, причем образуются микрошарики, которые отделяют. Эти микрошарики содержат водонерастворимую соль пептида и отдают замедленно пептид, когда их суспендируют в водной среде. Продукт отличается тем, самым также и по внешнему виду от

BEST AVAILABLE COPY

продуктов согласно, например, патенту ФРГ DE-4023134. При этом продукты согласно изобретению в сферической форме могут быть получены с заданной величиной. Величина сферических частиц зависит от получения эмульсии, причем играет роль, например, скорость перемешивания. В сравнении с известными продуктами содержание пептидного действующего вещества в заявляемом продукте может быть повышено, причем возможно содержание действующего вещества в 5, 10, 20 и более массовых процентов.

Таким образом, осуществляя сначала превращение водорастворимой соли пептида в соль пептида, нерастворимую в воде, в соответствии с изобретением, специалист получает возможность воспользоваться разницей растворимостей используемых ингредиентов, в частности, разницей между "растворителями" и "не растворителями", используемыми в способе.

Указанный способ отличается тем, что:

а. водорастворимую соль пептида формулы (I) превращают в соль пептида, нерастворимую в воде;

б. приготавливают суспензию указанной соли пептида, нерастворимой в воде, в органической среде, содержащей растворенный в ней полимерный материал, поддающийся биологическому разложению;

с. указанную органическую суспензию диспергируют в водной среде, образующей непрерывную фазу получаемой в результате эмульсии;

д. указанную эмульсию переносят в избыток водной среды и, наконец, отделяют от жидкой фазы полученные таким образом микросферы.

Первая стадия способа состоит в том, что превращают водорастворимую соль пептида в соль пептида, нерастворимую в воде. Под "водорастворимой" солью понимают М соль пептида, обладающую растворимостью в воде, большей или равной 0,1 мг/мл при 25°C, предпочтительно большей или равной 1,0 мг/мл.

Под "нерастворимой в воде" солью понимают соль пептида, обладающую растворимостью в воде более низкой или равной 0,1 мг/мл при 25°C. Пептидные соли, такие как палмат, таннат, стеарат или пальмитат, относятся к этому определению.

В качестве биоразлагающегося полимерного материала используют полилактид, полиглицолид, сополимер молочной и гликолевой кислот.

Предпочтительно использовать в качестве полимерного материала сополимеры молоч-

ной и гликолевой кислот (PLGA), в частности, сополимеры кислоты L или D, молочной кислоты, содержащие 45-90 мол.% звеньев молочной кислоты и соответственно 55-10 мол.% звеньев гликолевой кислоты.

В качестве растворителя выбранного полимерного материала используют такой органический растворитель, как, например, метиленхлорид, во всяком случае это должен быть растворитель, не ведущий себя как "растворитель" по отношению к соли пептида, удерживаемой (во взвешенном состоянии) в полимерном материале.

Согласно изобретению, после образования суспензии указанной соли в органическом растворе полимерного материала эту суспензию соединяют с определенным количеством водной среды, представляющей собой обычно воду с добавкой специального поверхностно-активного вещества. Это делается с целью быстрого образования однородной эмульсии типа масло в воде, при этом указанная водная среда служит непрерывной фазой. В приготовлении такой эмульсии участвуют разнообразные факторы, обуславливающие размер или структуру микросфер, получаемых в результате этого процесса. Один из факторов, которые следует учитывать - скорость введения органического раствора в водную среду, другим фактором может служить температура или также скорость перемешивания или энергия диспергирования (с помощью ультразвука), последний фактор, в частности, влияет на размер микросфер конечного продукта. Применение методов и условий эмульгирования, соответствующих преследуемой цели, в возможностях специалиста в данной области.

В способе получения указанной эмульсии может быть также выгодным изменение объемного соотношения составляющих ее фаз, а именно уменьшение начального объема органической фазы по отношению к начальному объему водной фазы. В одном из случаев, благодаря летучести используемых органических растворителей, например, метиленхлорида, для этого может оказаться достаточным испарение, спонтанно возникающее при перемешивании; в других случаях можно ускорить желаемый процесс путем частичного выпаривания при пониженном давлении.

После образования стойкой эмульсии последняя переносится в избыточное количество водной среды, обычно воды.

Целью этой операции является усиление сгущения зародышевых микросфер, образовавшихся в эмульсии, путем извлечения еще присутствующего в указанных микро-

сферах органического растворителя. Эта операция имеет также целью одновременное удаление еще имеющихся следов поверхностно-активного вещества, которое могло остаться в полимерной массе при окончательном затвердевании. Отметим, что вода не является растворителем как для полимерного биоразлагающегося материала, которым может быть, например, PLGA, так и для соли пептида, содержащейся в указанных микросферах. Эта ситуация соответствующим образом способствует необходимому извлечению остаточного растворителя полимера, например CH_2Cl_2 .

После перенесения указанной эмульсии в избыток водной среды, отбирают отвержденные микросферы с помощью известных методов, например, центрифугированием, фильтрацией или деконтацией. Осуществляют также промывку, очистку и сушку.

Одним из преимуществ способа согласно изобретению является то, что он позволяет получать микросферы с управляемыми с точностью размерами, это управление в основном осуществляется в процессе получения эмульсии, например скоростью перемешивания. Другим преимуществом является исключительно высокое наполнение пептидами, которое способ позволяет получать 5, 10 или 20 мас. % и более, в различных случаях. Кроме того, выход операции введения пептида или соли пептида исключительно велик, что достигается благодаря предварительному превращению водорастворимой соли пептида в соль пептида, нерастворимую в воде.

Микросферы, полученные способом согласно изобретению из вышеуказанных ингредиентов, в дальнейшем используются, после соответствующей стерилизации, для приготовления суспензий, предназначенных для парентерального введения, например, путем внутримышечных или подкожных инъекций.

Пример 1. 3 г ацетата аналога LHRH формулы
 $\text{Ac-D-Nal-D-pCl-Phe-D-Pal-Ser-Tyr-D-Cit-Len-Agr-Pro-D-Ala-NH}_2$

были превращены в соответствующий пептоат с помощью известных методов и обработаны таким образом, что были получены частицы со средними размерами около 19 мкм.

Приготовлена суспензия 0,317 г указанного пептоата и 1,683 г PLGA 75:25 (мол. %) в 20 мл CH_2Cl_2 , содержащая в растворенном виде 1,683 г сополимера кислот молочной (D, L и гликолевой (PLGA) 75:25 (мол. %) собственная вязкость 0,82 в HPLP). Смешивание осуществлялось при температуре ок-

ружающей среды при перемешивании с целью получения однородной суспензии.

Полученную суспензию затем выгружали в один прием в 50 мл 0,075%-ного раствора метоксицетиллозола в воде, после чего в течение около 90 мин при температуре окружающей среды осуществляли перемешивание смеси (скорость перемешивания: 900 об/мин). Изменение состояния эмульсии периодически проверялось, в среднем каждые 30 мин, путем отбора проб и исследования появившихся микросфер под микроскопом.

После окончания перемешивания (стабилизации уменьшения размеров микросфер) указанная эмульсия была перенесена в один прием в 2 л воды, поддерживаемой при 10°C, и полученная смесь перемешивалась до однородного состояния.

Микросферы PLGA были отделены от реакционной смеси и очищены путем многократного центрифугирования в перемешку с промывкой водой, затем отфильтрованы и просушены при пониженном давлении. Было собрано таким образом 1,61 г (выход 80%) микросфер PLGA, содержащих более 94% частиц диаметров менее 100 мкм (55-85 мкм максимально).

Анализ (растворение массы PLGA, извлечение и определение пептида с помощью HPLC) показал, что содержимое в микросферах пептоата составляет 9,05 мас. % (расчетное содержание: 100%).

Полученные таким образом микросферы были затем подвергнуты стерилизации гамма-излучением и из них была образована суспензия в специальном стерильном носителе. Испытания *in vivo* (определение содержания тестостерона в крови у крыс самцов) подтвердили равномерное выделение активного вещества.

Пример 2. Действовали так же, как описано выше в примере 1, используя 0,634 г пептоата аналога LHRH на 1,366 г PLGA 75:25.

Микросферы PLGA: 1,70 г (выход 85%).

Содержание полезного наполнителя 18,3% (расчетное: 20%). Полученные таким образом микросферы были затем подвергнуты стерилизации гамма-излучением и из них была приготовлена суспензия в специальном стерильном носителе. Испытания *in vivo* (определение содержания аналога в сыворотке крови у крыс самцов) подтверждают равномерное выделение биологически значимого количества активного вещества по меньшей мере в течение 24 сут (см. таблицу).

Эти результаты были подтверждены также анализами забитых животных через

30 сут.: потеря веса тестикулов по меньшей мере на 80%, потеря веса семенников и пузырьков по меньшей мере на 90%.

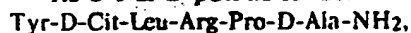
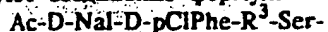
Пример 3. Приготовлен по примеру 1, использован 3 г ацетата аналога LHRH формулы



После преобразования этого ацетата в соответствующий паомат и операций переработки, описанных в примере 1, были получены микросферы из полимерного материала, имеющие те же характеристики, что и предыдущие.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция в форме микросфер для пролонгированного и контролируемого высвобождения пептидного лекарственного вещества, содержащая нерастворимую в воде соль паомата, танната, стеарата или пальмитата пептида и биоразлагающийся полимер, содержащий молочную и гликолевую кислоту, отличающаяся тем, что в качестве пептида используют соединение формулы



где R^3 - D-Pal или D-Trp,

причем количество соли пептида составляет по меньшей мере 5% от массы биоразлагающегося полимера.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что сополимер из молочной и гликолевой кислот представляет собой сополимер из L- или D, L-молочной кислоты, содержащей 45 - 90 мол.% звеньев молочной кислоты и 55 - 10 мол.% звеньев гликолевой кислоты.

3. Композиция по пп.1 и 2, отличающаяся тем, что в виде микросфер она содержит в качестве соли пептида паомат, а сополимер молочной и гликолевой кислоты находится в молярном соотношении 75 : 25.

Таблица

Срок (количество суток)	Определение содержания пептида (нг/мл)
0+3 ч	47,1
1	48,9
2	52,2
3	46,9
6	50,4
8	40,1
10	42,1
14	29,8
16	33,5
20	33,0
24	25,6

BEST AVAILABLE COPY

Заказ 444 Подписное
ВНИИПИ, Рег. ЛР № 040720
113834, ГСП, Москва, Раушская наб., 4/5

121873, Москва, Бережковская наб., 24 стр. 2.
Производственное предприятие «Патент»